

Descripción de técnicas de criopreservación de semen canino

Description of canine semen cryopreservation techniques

Elizabeth Corrales Mafla¹, Hilary Bedoya Arcila¹, Juan Carlos Echeverry López²

¹ Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Tecnológica de Pereira

² Docente Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Tecnológica de Pereira

Resumen

La inseminación artificial se utiliza como herramienta de mejoramiento genético en diferentes especies incluida la canina. Sin embargo, en esta última especie, también es utilizada como una herramienta clínica, por ejemplo, en hembras con vagina estrecha, hembras con problemas conductuales, machos con problemas de estatura con respecto a la hembra o debilidad a la hora de la monta. El método utilizado en Colombia para realizar la inseminación artificial es por medio de semen fresco. El presente trabajo describe la técnica de criopreservación de semen canino. Analiza paso a paso desde la colecta, el análisis del semen, los diluyentes empleados y las técnicas de criopreservación. Se utilizaron bases de datos como Scielo, Science Direct, Scopus y Google Académico utilizando conectores booleanos como And, Or y Not, al igual que palabras claves, criterios de inclusión como reportes del 2010 hasta la fecha actual. Se recomiendan estudios de laboratorio para implementar esta técnica en el país.

Palabras clave: genética, inseminación artificial, reproducción.

Abstract

Artificial insemination is used as a tool for genetic improvement in different species including the canine. However, in this last species, it is also used as a clinical tool, for example, in females with a narrow vagina, females with behavioral problems, males with height problems with respect to the female or weakness when it comes to riding. The method used in Colombia to carry out artificial insemination is by means of fresh semen. The present work describes the canine semen cryopreservation technique. It analyzes step by step from the collection, the semen analysis, the diluents used and the cryopreservation techniques. Databases such as Scielo, Science Direct, Scopus

and Google Académico were used using Boolean connectors such as And, Or and Not, as well as keywords, inclusion criteria such as reports from 2010 to the current date. Laboratory studies are recommended to implement this technique in the country.

Key words: genetics, artificial insemination, reproduction

Introducción

La inseminación artificial (IA) se presenta en muchas especies para conservar estándares como belleza, mejoramiento genético y adquirir diferentes habilidades, todo esto principalmente en especies como bovinos, equinos, porcinos, ovinos y caninos. Sin embargo, en esta última especie, también es utilizada como una herramienta clínica, por ejemplo, en hembras con vagina estrecha, hembras con problemas conductuales, machos con problemas de estatura con respecto a la hembra o debilidad a la hora de la monta. Son múltiples los beneficios que la inseminación artificial puede aportar a los caninos si se usa el procedimiento y las técnicas adecuadamente.

Existen diferentes formas de manejo del semen que es utilizado para la IA en animales, entre ellas está la IA con semen congelado, una técnica eficaz utilizada para la conservación de diferentes razas que pueden ir desapareciendo drásticamente con el tiempo, también para la utilización de un semen de un macho que ya no se encuentra apto para la reproducción pero tiene un gran valor genético o la utilización de semen de una raza que no se encuentra en el país y debe ser transportado por un periodo largo de tiempo, etc., sin embargo, en Colombia la utilización del uso de semen congelado en la especie canina no se ha estudiado ni utilizado de manera regular, ya que hay más enfoque en especies de producción como equinos, bovinos y porcinos, desaprovechando por ejemplo oportunidades de negocio, como también la ampliación de nuevas razas caninas que no se encuentran en el país, la utilización de semen de machos de un buen valor genético y poder evitar la desaparición de diferentes razas.

En los últimos años en Colombia se han construido muchos criaderos de perros que requieren camadas de un alto valor genético, sanidad y habilidades que les ayude a

adaptarse al medio en el que se van a encontrar, ya que son muchos los hogares que desean tener una mascota en su casa, siendo los perros la especie favorita. Muchos propietarios deciden operar a sus hembras o machos con el fin de disminuir la aparición de enfermedades y los embarazos no deseados provocando un control en la población de esta especie, pero limitando también la consecución de razas específicas, lo cual se podría manejar con el uso del semen congelado y la creación de bancos de semen.

Por lo cual, al recopilar información necesaria del tema, se busca contribuir a que haya un mayor conocimiento sobre el uso del semen congelado en caninos, que permita tener opciones de reproducción idóneas en esta especie.

También, con la elaboración de este proyecto, se pretende ampliar la información para que el personal médico veterinario y estudiantes puedan ampliar sus horizontes e inclusive realizar trabajos de investigación concernientes al tema.

Según la revisión de M.A. Stornelli el uso de inseminación artificial por primera vez en animales domésticos sucedió en 1780 cuando Lázaro Spallanzani obtuvo de una perra raza Spaniel dos cachorros, macho y hembra respectivamente, con semen fresco. La primera preñez obtenida con semen refrigerado la logró Harrop en 1956 y consecuentemente ya en 1969 se da una IA con semen congelado exitosa (1). Durante el año de 1987 Walter Heape, realiza un estudio sobre inseminación artificial en caninos y deduce que durante una sola eyaculación, se podrían servir varias perras, siendo esto una poderosa herramienta para investigar los diversos componentes genéticos (2). El éxito de los espermatozoides en el proceso de congelación y descongelación fue relevante en el desarrollo de la inseminación artificial (3).

Las células espermáticas son expuestas a soluciones que contienen agentes crioprotectores, los cuales evitan parcialmente la formación de hielo intracelular y el daño en las membranas (4). La criopreservación de semen en caninos tiene como mayor uso preservar y difundir material genético de alto valor (5); sin embargo, en el proceso de criopreservación se describen algunas alteraciones como la conformación de la membrana plasmática espermática, alteraciones de la función en

la mitocondria y en la integración del ADN (6). Diversas alternativas han sido implementadas con el fin de mejorar los resultados de los procedimientos de criopreservación de semen canino, considerando aspectos como el método de congelación, la composición de los diluyentes con el uso de nuevas moléculas y la concentración y la naturaleza de los crioprotectores empleados (4). El crioprotector más usado entre los mamíferos y como tal los caninos es el glicerol (GYL) (7), pero este a su vez está asociado con daño en los espermatozoides (8)(7). Los crioprotectores son agentes hipertónicos que hacen primeramente encoger a la célula, pero al momento en el que este entra a la célula recupera su volumen. Cuando la célula entra en el proceso de congelación se encoge ya que sale agua de ella y así se forma el hielo extracelular; al formarse hielo intracelular la membrana pierde propiedades semipermeables y finalmente ocurre muerte de la célula. La velocidad de enfriamiento que se utilice determina así la velocidad de descongelación y de supervivencia de la célula (9).

Diferentes diluyentes han sido evaluados para criopreservar semen en caninos (10), Held en 1997 explica que para que un diluyente sea efectivo debe contener sustancias parecidas al plasma seminal, pues este lo debe proteger durante un tiempo determinado, por ello un diluyente debe tener ciertos compuestos básicos como una fuente de energía (azúcares), un buffer o amortiguador para mantener el balance de pH (Tris o citrato de sodio); osmolaridad de la solución (sustancias iónicas o no iónicas), una fuente de lipoproteínas o material con alto peso molecular (leche o yema de huevo) que proteja durante la congelación (2). En diferentes reportes de criopreservación de semen canino, la yema de huevo ha sido un aditivo común en los diluyentes (11), es el componente más efectivo para proteger al espermatozoide del shock de frío. Este componente previene la aparición de colas dobladas y protege la movilidad. El compuesto activo en la yema de huevo es la fracción de lipoproteína de baja densidad, una molécula de alto peso molecular que solo puede actuar en la superficie celular (10).

A la hora de medir la eficacia de las técnicas y diluyentes empleados para la refrigeración o congelación de semen, la prueba más adecuada es la determinación de los porcentajes de concepción y el tamaño de la camada resultante de la

inseminación artificial, sin embargo, independientemente de la técnica de preservación elegida como así también del método de evaluación seminal, es importante tener en cuenta que una adecuada recolección y procesamiento del semen serán la clave inicial para la obtención de una muestra de calidad, y condicionarán los posteriores resultados del almacenamiento de los espermatozoides en frío (12).

La conservación a 4°C es de las más estandarizadas, sin embargo, tiene desventaja en su tiempo de almacenamiento debido a la reducción de la fertilidad con el pasar de las horas. El semen refrigerado es de utilidad para inseminar repetidamente en el ciclo de una perra (13,14). Se describe que el semen es más longevo a 4°C que a 22°C (1,13,15).

Mediante la congelación, es posible el uso del semen de un macho cuando este ya no puede ser usado como reproductor, inseminar una hembra que se encuentre en una localización geográfica distante y almacenar semen en épocas en las cuales el reproductor no sea requerido para servicios (16). También se realiza para una mayor preservación del semen a través del tiempo; el proceso consiste en la extracción de semen del macho, su análisis para comprobar que reúne las características necesarias para su congelación, su posterior mezcla con diluyentes especiales que van a protegerlo de los cambios de temperatura y a nutrirlo (2), después se mantiene con nitrógeno líquido que se considera más efectivo por sus resultados al descongelarse, espermatozoides móviles del 60% a 70 % y fertilidad de 60% (13,17).

La congelación de semen con ultracongeladores a -152°C es otro medio, pero sus valores espermáticos no tienen diferencias significativas con el nitrógeno líquido (13,18). Sin embargo otro estudio demuestra un uso potencial de semen congelado con ultracongelador a -80°C como alternativa al nitrógeno líquido (19). Las pajillas utilizadas para congelar semen canino son de 0,5 o 0,25 ml por su fácil identificación y manejo al descongelar (1,13). Se habla de un bajo porcentaje de supervivencia de espermatozoides a la descongelación (40% y 50%) (1,6), por tanto se deben considerar protocolos que tengan alto porcentaje de supervivencia como de la integridad de las células (1,20).

Con este trabajo se buscó, describir las técnicas de criopreservación de semen canino.

Materiales y Métodos

Para la recopilación de la información se investigaron bases de datos como Scielo, Science Direct, Scopus, Google Académico utilizando conectores booleanos como And, Or y Not, al igual que palabras claves, criterios de inclusión como reportes del 2010 hasta la fecha actual, artículos de todos los países, entre otros.

Resultados y discusión

Existen diferentes diluyentes utilizados en criopreservación.

La yema de huevo (YH) es un aditivo que se usa frecuentemente como diluyente para la criopreservación de semen canino, a la cual se le reconoce un efecto protector por su fracción de lipoproteínas de baja densidad, que genera resistencia al choque térmico y mejora la movilidad, debido a que evita la pérdida de los fosfolípidos de membrana (21)(22). Por otro lado, se sabe que la YH produce riesgo biológico, alteración de la integridad del acrosoma, fosforilación oxidativa de los espermatozoides, entre otros (23). También altas proporciones de YH requiere adición de detergentes como la pasta Equex STM para solubilizarla (24).

En un estudio al precipitado de espermatozoides extraídos de semen epididimal, este se preparó con diluyente para congelación de semen (Triladyl, Minitube, Alemania) y yema de huevo centrifugada (YHC) al 10% o 20% (proporción 3:1 de yema con agua ultra pura, centrifugada a 1600 g durante 99 min a temperatura ambiente). Posteriormente realizaron la congelación, evaluación poscongelación y análisis estadístico. Sus conclusiones fueron que la YHC puede ser utilizada como suplemento en el diluyente para la congelación de semen epididimal canino y que el uso de un 10 % de YHC en el diluyente de congelación, favorece la cinética posdescongelación de los espermatozoides epididimales, en comparación al uso de un 20% de la misma (11).

La Pasta Equex STM es un detergente. Parte de su componente es dodecil sulfato de sodio (SDS) y ha sido incluida en diluyentes de semen para congelación de este (25). Un estudio comparativo de diluyentes demostró que aquel al que se le

adicionaba pasta Equex, presentó un 48% de espermatozoides móviles y una mejor diferencia significativa para acrosomas intactos que con LDL (lipoproteínas de baja densidad) y yema de huevo sola; concluyó dicho estudio, que presenta desventajas en cuanto a tiempos de disolución y al tener 20% de yema en su composición interfería al analizar las imágenes por aparición de gránulos que podían confundirse con espermatozoides vivos o muertos (25).

Otro estudio concluyó similarmente que un medio de LDL al 6% + glutamina 20 mmol era superior a Equex para los parámetros estudiados: VAP (velocidad media), VCL (velocidad curvilínea), VSL (velocidad rectilínea) y ALH (amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza). Se afirmó también que el proceso de usar un diluyente para congelar semen tiene mayor dificultad con Equex (21).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentan complejidades. Hay efectos adversos de la yema de huevo. Se ha intentado utilizar su fracción crioprotectora, que son las lipoproteínas de baja densidad (23)(25). En un estudio se comparó sus efectos con otros diluyentes, Equex y yema de huevo. La dilución constó de cien microlitros de LDL y YH en tubos de ensayo en baño de agua María a 37°C, más 200 microlitros de semen, obteniendo una concentración de 100×10^6 espermatozoides/ml. Al final se obtuvo muestras de 400 microlitros o más y para la pasta Equex requirió más dilución. Los resultados y conclusiones es que LDL al parecer tiene cualidades crioprotectoras similares al Equex, aunque con datos mejores para motilidad (49.9 %) y de espermatozoides que no presentaron alguna anomalía con LDL después de la descongelación (54%). Tampoco interfirió con la fertilidad de los espermatozoides ni con la fertilización, además de ser junto con Tris más fácil de utilizar y de manipular en la congelación, LDL tiene menos errores en el analizador de imágenes y no requiere preparación previa en comparación con Equex (25).

Otro estudio comparativo de LDL 6%, (en este caso + glutamina 20 mmol) con yema de huevo Tris y Equex STAMP; concluyó similarmente que LDL mejoró la motilidad y características del movimiento de los espermatozoides, también fue superior en las velocidades medias de VAP, VCL, VSL (excepto para YH) y ALH. Además, LDL obtuvo buenos resultados en calidad de espermatozoides congelados (21).

También se ha empleado como diluyente leche descremada. En un estudio comparativo se evaluó el diluyente en base a yema de huevo (EYT), el cual contenía Tris (3.025g) ácido cítrico (1.7g), glucosa (1.25g), penicilina benzatínica (100mg), sulfato de estreptomicina (100mg), yema de huevo (20%) y agua destilada (100 ml); contra el diluyente a base de leche descremada (LD), que contenía leche descremada fluida UHT (0.5% materia grasa), adicionada con sulfato de magnesio (50 mg/100 ml) y penicilina benzatínica (50 mg/100 ml).

El diluyente a base de EYT mostró mayores valores de motilidad progresiva entre las 24 y 96 horas de refrigeración ($93.0 \pm 4.5 - 85.0 \pm 6.5$), explicado gracias a que la composición que incluye sustancias buffer y azúcares, como también lipoproteínas, tienen la capacidad de estabilizar la membrana en condiciones de shock térmico cuando interactúa con la estructura lipídica del plasmalema. En contraste, los resultados de LD para motilidad progresiva ($88.0 \pm 6.7 - 75.0 \pm 8.0$) fueron muy buenos, que se debe también a las lipoproteínas de la leche que protegen del shock térmico a la membrana plasmática del espermatozoide. Los valores para la prueba hipoosmótica en ambos diluyentes fueron superiores al 60 % durante todo el ensayo.

La conclusión de este estudio aprueba la utilización de leche descremada UTH (0.5% materia grasa) para la conservación de semen canino a 4° C, ya que proporciona resultados de motilidad progresiva e integridad de membrana espermática que permite ser utilizada en inseminación artificial hasta por 96 horas de refrigeración (26).

El agua de coco en polvo, (ACP-106c), también ha sido evaluado para la congelación y fertilidad el semen canino, como diluyente (27). El estudio habla de la dilución de ACP-106c con yema de huevo al 10% y glicerol al 6%. Tras la descongelación se evidenció una media de motilidad espermática, y después de la inseminación, una tasa de preñez de 60% y una tasa de partos de 50%. En conclusión el estudio aprueba el uso de ACP-106c con éxito para la congelación y fertilidad el semen canino (27).

Colecta de semen canino

Antes de iniciar la colecta del semen, el animal debe ser higienizado en su región abdominal y prepucial con abundante agua. Posteriormente, se debe secar el área con el fin de evitar la contaminación y alteración de la muestra seminal (28); por lo general se requiere la presencia de una hembra, si se encuentra en celo mejor, para la provocación del macho y favorecer la producción de una elevada cantidad de espermatozoides. Si la hembra no está en celo se le puede frotar en su cuarto posterior secreciones de hembras en estro o feromonas artificiales, para así excitar al macho (29). La mayoría de machos, una vez acostumbrados a la recolección, no requieren la presencia de la hembra (30); es importante también evitar al máximo la presencia de personas, en lo posible, para disminuir el estrés y los distractores en el momento de tomar la muestra (2).

En el perro, el eyaculado se divide en tres fracciones bien diferenciadas entre sí, cuya eliminación ocurre progresivamente durante la eyaculación, si bien en animales muy entrenados es posible observar un periodo de latencia entre cada una de las fracciones (31).

La primera fracción que el animal eyacula es la pre-espermática, que es pobre en espermatozoides, muy escasa y es proveniente de la próstata; generalmente es un líquido transparente e incoloro y tiene como función limpiar la uretra (2,30), posteriormente sigue la fracción espermática, rica en espermatozoides y de color blanquecino lechoso; luego de la fracción espermática comienzan los movimientos pulsátiles de la uretra y es en este momento que comienza a eyacularla tercera fracción también proveniente de la próstata, nuevamente carente de espermatozoides, traslucido e incoloro (2).

Existen varios métodos para recolectar semen como son la vagina artificial, el electroeyaculador y el método de la masturbación o la técnica de la mano enguantada (32).

La masturbación manual o la técnica de la mano enguantada es el método más utilizado en la especie canina y consiste en la estimulación manual del bulbo del

pene (33), con este método no se requieren implementos especializados y por lo tanto es de bajo costo (34).

El Médico Veterinario Zootecnista con la mano enguantada con un guante no espermicida ingresa por la parte posterior entre los miembros posteriores del animal hacia la parte caudal del bulbo del glande, la estimulación se lleva manualmente a través del prepucio. Se produce una semierección y la vaina prepucial se debe deslizar hacia atrás liberando el bulbo del glande (35), esto con el fin de evitar el dolor que ocasionaría la presión que ejerce el bulbo peneano contra el prepucio, lo que impediría la erección total y la posterior eyaculación (28).

Otra forma es realizar un movimiento rápido y rítmico de atrás hacia delante sobre la zona del bulbo. Las pulsaciones uretrales comienzan casi en forma inmediata y algunos perros muestran movimientos de empuje mientras se desarrolla la erección completa, una vez esto ocurra el pene completamente erecto es rotado 180° manteniendo el dorso del pene dorsalmente (34) de igual forma que cuando el canino establece un contacto de colas en el acto sexual (35); posteriormente se debe fijar el recipiente y coleccionar la muestra seminal, la cual deberá ser preservada en oscuridad a una temperatura de 37 °C (28). Finalizada la recolección manual, se debe proteger el pene de lesiones hasta que pierda la erección (34).

Un beneficio de este método es la facilidad para evaluar abrasiones, heridas, signos de inflamación, tumores venéreo transmisibles, entre otros (35).

Otro método es el de la vagina artificial, la cual está formada básicamente por un cilindro rígido de unos 15 cm de longitud que se encuentra rodeado por una camisa de caucho donde se deposita agua a 40 °C a través de una válvula; en algunos casos también es posible insuflar aire para aumentar la presión, en un extremo del cilindro se coloca un embudo de caucho que está unido a un tubo colector graduado a 37 °C. La técnica consiste en introducir el pene dentro de la vagina artificial cuando haya alcanzado más de un 50% de erección; el pene se coloca en el interior de la vagina una vez que está erecto y que se haya exteriorizado el bulbo, colocando los dedos detrás del bulbo y empujando suavemente el pene dentro de la vagina artificial hasta conseguir la eyaculación. Es posible retirar el pene sin que se haya eliminado completamente la tercera fracción, pero debe hacerse con cuidado para

evitar provocar laceraciones e infecciones (33). No es un método de mucha aceptación por la presencia de lubricantes, ya que pueden afectar la movilidad espermática (36).

También se emplea el electroeyaculador. Este sistema permite obtener semen de animales que posean la vía neurológica implicada intacta (37), se usa básicamente con fines de investigación o para la obtención de semen en cánidos salvajes como el lobo o el zorro, pero no se considera un método óptimo de recogida habitual en el perro porque se desconoce hasta qué punto afecta a la libido del animal (31), es necesario anestesiarse el animal para evitar molestias (30).

El equipo está constituido por un electrodo bipolar y una fuente variable de corriente alterna (33). La técnica consiste en colocar en un polo del electroeyaculador una pieza metálica con el grosor de un lápiz y que tenga 10 cm de longitud; luego dar pequeños pulsos eléctricos muy leves en la próstata y, la otra pinza, se fija en los sacos anales y se aplican estímulos eléctricos de 1-3 segundos con descansos de 7-9 segundos (38). Existen diferencias en cuanto al modo de operar y en cómo los animales responden a distintos tipos de electroeyaculadores, la elección de estos es una cuestión de preferencia personal (32).

En algunos trabajos se ha comprobado que la concentración y la motilidad espermática no difiere entre semen obtenido por estimulación manual y mediante electroeyaculación (33).

Análisis del semen

El análisis seminal es un estudio que brinda información sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides presentes en el eyaculado y es imprescindible para determinar tanto la producción espermática como la funcionalidad de las glándulas sexuales accesorias (39). Para la calificación de la fertilidad potencial hay que registrar color, volumen, olor y características microscópicas como porcentaje de motilidad progresiva, concentración espermática y porcentajes de espermatozoides vivos (29).

El color y la opacidad de la muestra de semen debe observarse inmediatamente después de la recolección (29). Normalmente es de color blanco lechoso, pero está

en estrecha relación con la concentración espermática (40), dependiendo de ésta puede variar su intensidad a blanco nacarado, blanquecino, blanco oscuro u opalescente (38). Cualquier cambio de color puede ser indicio de algún problema en el sistema reproductor; un semen de color claro e incoloro sugiere azoospermia (41), el color rojo indica la presencia de sangre, ya sea de la superficie del pene o de la próstata, el color amarillo indica la presencia de orina, partículas blancas pueden ser indicativas de la presencia de leucocitos (42) y una coloración verde, con o sin cúmulos, coágulos o escamas, sugiere pus o infección en el aparato reproductor (41).

En general, cualquier color anormal debe alertar al médico respecto a la posibilidad de un problema y es necesario considerar el estudio cuidadoso del aparato reproductor. Cualquier agente, por ejemplo, orina, pus, sangre, que modifique el color puede afectar la concentración, la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides (41).

El rango del eyaculado es de 0,1 – 15 ml, y se ha visto casos de hasta 30 ml, esto va depender mucho del tamaño del perro, la edad, el clima, la raza, etc. (38); lo más frecuente es que en función de la raza y el perro, se obtengan volúmenes de 0,1 – 2 ml de la primera fracción, 0,2 – 4 ml para la segunda y 1 – 30 ml de la tercera fracción (31). El volumen debe registrarse antes de eliminar alguna muestra; este valor se necesita para calcular el número total de espermatozoides en el eyaculado (42).

El volumen del eyaculado se valora mediante observación directa en el tubo colector graduado (31) y éste no tiene correlación con la fecundidad, a menos que el animal no eyacule (41).

El olor es algo característico y propio del semen canino, este olor procede de las glándulas perianales, glándulas prepuciales y sacos anales. En este caso lo que no se busca es que el semen tenga un olor pútrido o amoníaco. Es por eso que al olor del semen se le denomina “Sui generis” (38).

La motilidad y el número de los espermatozoides son dos de los tres pilares que sostienen la estructura diagnóstica del análisis del eyaculado. La morfología

constituye el tercer pilar y comprende la diferenciación cualitativa y cuantitativa de espermatozoides normales y anormales y la distinción de otras células no espermáticas (39).

La motilidad espermática puede ser subjetivamente estimada por observación directa al microscopio u objetivamente determinada por sistemas computarizados (43); se puede evaluar con una gota de semen que se deposita en un portaobjetos y se observa el movimiento de los espermatozoides, generando así una película fina que permita determinar el porcentaje de células móviles presentes en la muestra. El microscopio a utilizar debe poseer una platina térmica (28), se observa la existencia eventual de “oleadas”, movimientos de flujo y reflujo provocados por la reunión y posterior dispersión de los espermatozoides; la existencia de estas ondas se considera generalmente como indicio de buena vitalidad y alta concentración de los espermatozoides en el eyaculado. El número de campos valorados es un mínimo de diez, siempre en el centro de la muestra, para obtener valores objetivos, con platina temperada a 37°C (44), es importante mantener la temperatura corporal del animal en el porta y cubreobjetos, ya que golpes de frío pueden alterar la motilidad de los espermatozoides (45).

Se establece el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, motilidad en el lugar e inmóviles (45).

La motilidad se puede clasificar como muy buena cuando el 80 – 100 % de espermatozoides presentan motilidad progresiva, buena cuando el 60 - 79 % de espermatozoides presentan motilidad progresiva, regular cuando el 40 - 59 % de espermatozoides presentan motilidad progresiva y pobre cuando menos del 40 % de espermatozoides presentan motilidad progresiva (44); por lo general, en una muestra de semen normal se espera una motilidad anterógrada progresiva del 70 - 80 % (45).

La concentración espermática también es uno de los parámetros de mayor importancia para establecer la fertilidad en un individuo. Su cuantificación es variable en función del volumen recogido, número de espermatozoides producidos por el macho y fracción o fracciones del semen recogidas (46). En un eyaculado normal existen de 200 a 1000 millones de espermatozoides/ml. En el caso de semen fresco para inseminación artificial se necesitan como mínimo 200 millones de

espermatozoides/ml para fecundar a una perra. Cuando es congelado es necesario una cantidad mayor debido a los que se pierden en el proceso de congelado y descongelado (45).

Existen diversos métodos destinados a la medición de la concentración espermática como el hemocitómetro (cámara de Neubauer o Burkner) que es el procedimiento tradicional y el cual consiste en realiza una dilución del semen con solución salina (habitualmente 1/40), homogeneizarla, colocarla en el interior de la cámara de Neubauer y dejarla reposar unos minutos; posteriormente, se realiza un recuento usando el microscopio con los objetivos de 10X y 40X (46).

Otro método es el espectrofotómetro convencional que se trata de un equipo de bajo costo que permite medir en pocos minutos (2 a 3 minutos) la cantidad de luz que absorbe una muestra de semen, correlacionándola con un alto grado de precisión con la concentración seminal (47); una variación de este sistema es el contador de partículas o Coulter counter, basado en sistemas computarizados capaces de reconocer y realizar el conteo de los espermatozoides en función de las características propias de cada especie (46).

La morfología está implicada en problemas de fertilidad. Su evaluación se hace en un frotis seminal coloreado; los colorantes comúnmente utilizados son Wright, Rosa de Bengala, Diff-Quik, Giemsa (48). Para establecer un porcentaje correcto de anomalías morfológicas deben contarse al menos 200 espermatozoides, refiriéndose a una teratozoospermia (signo casi exclusivo de patologías adquiridas) cuando haya más de un 30% de malformaciones de la cabeza, pieza intermedia o flagelo del espermatozoide, así como gotas citoplasmáticas y espermatozoides decapitados (49).

Las anomalías de los espermatozoides se pueden observar mediante el microscopio, al contar 100 espermatozoides y separando las anomalías en primarias y secundarias. La suma entre anomalías primarias y secundarias no deberá ser mayor de 20%, para poder considerar un semen apto para usar (48). En la especie canina, los defectos espermáticos primarios que se sabe que están asociados a infertilidad son gotas citoplasmáticas proximales, defectos del cuello y defectos de la pieza intermedia. Aunque los defectos secundarios, por ejemplo,

piezas intermedias plegadas o colas dobladas o enrolladas, se consideran menos graves que los primarios, ya que normalmente representan una respuesta transitoria frente a un estrés puntual, es obvio que si afectan a una gran proporción de los espermatozoides del eyaculado y van a comprometer la motilidad y la fertilidad (42).

En el análisis seminal se pueden evaluar características fisicoquímicas del semen como pH, osmolaridad y viscosidad; también la bioquímica seminal como fructuosa, ácido cítrico, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y se puede buscar la presencia de células no espermáticas en el eyaculado (39).

El pH normal del semen canino oscila entre 6,3-7 y depende de la cantidad de líquido prostático recolectado. Una disminución en el pH podría indicar una eyaculación incompleta o una inflamación de testículos o epidídimos (42); su determinación es muy sencilla con las tiras reactivas específicas para tal fin colocando unas gotas de semen en ellas, estando sostenidas por una pinza. La variación del pH disminuye la motilidad, por lo que es importante tomar en cuenta estas características en el uso de los diluyentes y de las sustancias tampón (40).

Existen una gran variedad de pruebas de laboratorio que han sido desarrolladas para evaluar la calidad del semen (integridad espermática y capacidad fecundante), y predecir así la capacidad fecundante del mismo (50); sin embargo, debe tenerse en cuenta que las pruebas *in vitro* nunca podrán predecir exactamente cuál será la capacidad fecundante del eyaculado en el momento que éste sea depositado en el aparato genital femenino (39).

Una prueba sencilla y de bajo costo para semen canino es la prueba de termorresistencia, la cual tiene por principio la exposición de los espermatozoides a las condiciones fisiológicas de temperatura del tracto genital femenino, a fin de estimar su capacidad de mantener la motilidad espermática, valorando que la temperatura intravaginal canina fluctúa entre 37.5 y 38.5 °C (51).

Los espermatozoides son células complejas que requieren cumplir con una serie de modificaciones con el objetivo de lograr la fecundación, especialmente a nivel de membrana plasmática. La integridad de ésta es uno de los parámetros evaluados con mayor frecuencia durante el análisis seminal de rutina y su determinación es útil

para predecir *in vitro* la capacidad fecundante del espermatozoide. La membrana plasmática del espermatozoide es esencial para algunas funciones metabólicas tales como la capacitación, interacción con células de la tuba uterina, reacción del acrosoma e interacción con la zona pelúcida, por lo tanto, la pérdida de su integridad es considerada como incompatible con la capacidad del espermatozoide de fecundar un ovocito *in vivo* (52).

Una de las pruebas que ha sido considerada de metodología simple, es la prueba hipoosmótica, cuyo fundamento es evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide (53).

La prueba hipoosmótica, reconocida como HOST por su denominación en inglés hypo-osmotic swelling test, es una prueba seminal simple y de bajo costo, que se fundamenta en que la suspensión de espermatozoides en un medio hipoosmótico ocasiona un desequilibrio entre los medios intracelular y extracelular, situación que la célula trata de compensar difundiendo agua al compartimento intracelular, considerando un aumento del volumen del espermatozoide. Esta situación se evidencia por cambios morfológicos característicos, tales como dilatación y enrollamiento de la cola (54). Otras técnicas para evaluar la membrana plasmática se basan en el uso de sondas fluorescentes con capacidades diferentes de atravesar la membrana, estas pruebas basadas en fluorescencia utilizan fluorocromos impermeables solos o combinados con tinciones fluorescentes permeables; los espermatozoides con membranas plasmáticas integras excluyen a aquellas tinciones impermeables, las cuales penetran y tiñen únicamente las células muertas. Tinciones específicas de fluorocromos proveen información cuantitativa, relativa a la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática, que discrimina entre un espermatozoide funcional de otro no funcional, aumentando la precisión de la estimación de la muestra (52).

Por otro lado, la fosfatasa alcalina es producida por los epidídimos y se usa para determinar la presencia de líquido epididimal en el eyaculado. Los perros azoospermicos con hipoactividad de fosfatasa alcalina seminal pueden tener obstrucción uni o bilateral de los epidídimos o una eyaculación incompleta(45)

Técnicas utilizadas para la criopreservación de semen canino

La criopreservación de semen canino se ha realizado mediante diferentes protocolos; la eficacia de un protocolo de criopreservación depende de una serie de factores como la composición del diluyente, la concentración y método de adición del crioprotector, el ritmo de la curva de enfriamiento y de congelación, y el ritmo de descongelación. El control y cuidado de estos factores debería reducir al mínimo los daños celulares, asegurar una adecuada longevidad y mantener la capacidad fecundante *in vivo* e *in vitro* (55).

El crioprotector tradicionalmente utilizado para la criopreservación de semen canino en varias partes del mundo es el glicerol que es un crioprotector permeable cuya función es evitar la formación de cristales intracelulares de hielo. El glicerol posee como limitante su toxicidad parcial, debida al estrés osmótico que genera, dado que tiene una menor velocidad de difusión a través de la membrana plasmática respecto a otros crioprotectores (4). Debido a esto, se han estudiado amidas tales como la dimetilformamida como posible agente crioprotector, debido a sus propiedades físico-químicas que le permiten una alta difusión a través de la membrana celular. Además, no se comporta como una sustancia tóxica durante la criopreservación y ha sido evaluada en la criopreservación de semen equino. Es considerada como una buena opción que permite el mejoramiento del proceso (56).

En un reporte de investigación elaborado en Brasil, donde se utilizó un diluyente a base de lactosa, yema de huevo y 5% de dimetilformamida, se encontraron porcentajes de movilidad del $45.5\% \pm 11.3$, integridad de membrana del $49.2\% \pm 6.6$, y de morfología normal del $65.3\% \pm 14.226$. Mientras en un estudio más reciente se encontraron resultados equiparables de movilidad, vigor y morfología en semen canino criopreservado con glicerol y metilformamida (57). Ambos crioprotectores son superiores para los mismos parámetros respecto a los resultados obtenidos con dimetilformamida, con lo cual la investigación plantea el uso promisorio de la metilformamida en dicho proceso (58); sin embargo, la dimetilformamida puede ser considerada una alternativa viable para la congelación rápida de semen canino, dado que en concentraciones del 5% permite alcanzar valores de movilidad progresiva superiores al 40%, y se comporta de manera equivalente al glicerol (5%),

en la protección de la integridad de la membrana plasmática y de la morfología normal de los espermatozoides (4).

Otros crioprotectores utilizados para la criopreservación de semen canino son el polietilenglicol y el dimetilsulfóxido. Este último ha demostrado tener una baja capacidad protectora en semen canino, mientras que el polietilenglicol, aunque presenta una similar movilidad, vigor y porcentaje de anormalidades morfológicas en los espermatozoides respecto al glicerol, se ha observado que aumenta el porcentaje de espermatozoides con velocidad curvilineal y desplazamiento lateral de la cabeza (posible capacitación), lo cual afecta la membrana y, por lo tanto, la longevidad del espermatozoide (59).

Durante los últimos años ha surgido un interés creciente en el uso de compuestos de origen vegetal, para ser adicionados a los medios de congelación en la criopreservación de espermatozoides. Se ha demostrado que la utilización de extractos obtenidos de algunas hierbas es beneficiosa para mejorar características espermáticas (60). Entre los extractos utilizados en la criopreservación de espermatozoides podemos mencionar: los extractos acuosos de raíz del ártico (*Rhodiola sacra*) que reducirían el proceso de peroxidación lipídica durante la congelación; extractos acuosos de romero (*Rosmarinus officinalis*) serían benéficos para la viabilidad y motilidad espermática, integridad acrosomal y funcionalidad de la membrana plasmática; el hinojo (*Foeniculum vulgare*) mejoraría la motilidad espermática y protegería contra la peroxidación lipídica. Sin embargo, el té verde (*Camellia sinensis*) no mejoraría la calidad de los espermatozoides descongelados (60).

En un estudio realizado en Chile, se llevó a cabo una investigación del efecto del extracto de hojas de arándano en la criopreservación de espermatozoides caninos y se llegó a la conclusión que la adición de extractos de hojas de arándano al medio de congelación, a concentración de 0,15 g de hojas añadidas a 100 ml de agua calentada a 100 °C y mantenidas a esta temperatura por 10min, no mejoró la motilidad espermática del semen canino descongelado (61). En otra investigación realizada en España se estudió la motilidad espermática en caninos adicionando romero al medio de congelación, la que se redujo significativamente, especialmente

con la concentración más alta del extracto de romero y se observó que el uso de romero no sería beneficioso para mantener la integridad acrosomal, pues los valores obtenidos post-descongelación fueron significativamente menores que sin la adición de romero (62). Sin embargo, son escasos los estudios que existen en espermatozoides de caninos criopreservados con antioxidantes de origen vegetal.

Por otra parte, también se ha estudiado los momentos de adición del criopreservante, específicamente del glicerol; se observaron los parámetros de calidad del semen al agregar glicerol al inicio de la curva de enfriamiento (T1), Al inicio y al final (T2) y al final (T3) (63). La congelación se realizó en nitrógeno líquido. Los resultados no mostraron diferencias significativas para estos 3 tiempos, por lo cual se recomienda por simplificación agregar todo el glicerol al inicio de la curva de enfriamiento (63).

Diferentes pruebas se han hecho para evaluar en qué condiciones y con qué compuestos se puede mejorar las condiciones de la congelación y descongelación del semen canino. Un estudio reciente (64), evaluó la adición de metformina (50 μ M y 500 μ M) al diluyente antes y después de la congelación. Entre sus resultados se encuentra que, después de la descongelación, los espermatozoides conservaron la misma viabilidad sin alterar la integridad de la membrana. La metformina mejoró la motilidad de los espermatozoides contra el grupo control, aumentando la actividad mitocondrial. La metformina también redujo el nivel de estrés oxidativo de los espermatozoides. Por lo cual resulta viable el uso de metformina en la congelación-descongelación de semen canino (64).

Los exosomas de semen canino acondicionado en células madre mesenquimales derivados de tejido adiposo es otro de los estudios que se han realizado (65). En este caso los espermatozoides tratados con exosomas fueron superiores a los del grupo control para los parámetros de motilidad ($56,8 \pm 0,3\%$ - $47,2 \pm 0,3\%$), porcentaje de espermatozoides vivos ($55,9 \pm 0,4\%$ - $45,4 \pm 0,4\%$), integridad de membrana ($55,6 \pm 0,5\%$ - $47,8 \pm 0,3\%$) e integridad acrosómica respectivamente ($60,4 \pm 1,1\%$ - $48,6 \pm 0,4\%$). Por lo tanto, el uso de exosomas, concluye el estudio, repara los espermatozoides dañados y disminuye la aparición de especies reactivas de oxígeno (65).

Otros compuestos como el hidroxitolueno butilado (BHT) se han puesto a prueba para los parámetros de calidad del semen post descongelación (66). En este caso se utilizó con diluyente a base de tris, a razones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mm BHT y el grupo control. Se obtuvieron resultados de mayor motilidad total, motilidad progresiva y velocidad de trayectoria promedio congelación- descongelación para el grupo 1.5 BHT frente al grupo control y los otros grupos de muestra. Los grupos 1.0 y 1.5 BHT fueron superiores en rectitud e integridad del acrosoma que los demás grupos. En cuanto a concentración de MDA fue más baja para los grupos 1.0, 1.5 y 2.0 de BHT. Por último se concluye en el estudio que a 1.5 BHT es la mejor concentración u óptima para mejorar la calidad post descongelación del semen canino (66).

La quercetina es un flavonoide de árboles subárticos que tiene resistencia a la congelación y se conoce como un fuerte antioxidante. Un estudio (67), examinó su efecto para la criopreservación del semen canino. Se tomaron grupos con 5 µg / ml y 10 µg / ml de quercetina diluidas en 0.1 % DMSO y agregado al diluyente en base a leche desnatada, además del grupo control. A los 30, 60, 90, 120 y 150 min los espermatozoides móviles totales fueron significativamente mayores después de la descongelación para los diferentes grupos contra el grupo control. El suplemento de quercetina al diluyente de leche desnatada mejoró la motilidad de los espermatozoides y además la fertilidad de estos tuvo mayor eficacia (67).

Conclusiones y recomendaciones

La congelación de semen canino presenta un gran avance en el mejoramiento genético y en la conservación de razas en peligro de extinción. Así mismo, el utilizar semen de caninos que existen alrededor del mundo plantea la posibilidad de acceder a semen de animales de difícil consecución. Se debe tener en cuenta que no sólo los caninos domésticos se ven beneficiados por esta biotecnología. Con caninos silvestres se podrían crear bancos de semen que permitirían la conservación de estas especies.

Desafortunadamente, los equipos utilizados en la preparación del semen de las diferentes especies, sirven para la mayoría de los animales domésticos, menos para los caninos. Para esta especie se requiere un equipo debidamente calibrado para tal fin. Esta situación hace que el estudio de la criopreservación de semen canino se

vea limitado. Es por este motivo que la inseminación artificial en el país se realice con semen fresco.

Se debe empezar por trabajar a nivel de laboratorio para lograr preñeces mediante el uso del semen congelado y realizar estudios que permitan mejorar las técnicas de conservación de semen, ya sea mejorando los diluyentes o cambiando técnicas de congelación y descongelación.

El presente trabajo, se convierte en un manual práctico para la congelación de semen canino, abarcando desde la colecta de semen, su análisis, diluyentes y las respectivas técnicas de criopreservación.

Bibliografía

1. Stornelli M, Stornelli M. Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado aplicación y desarrollo en caninos. *Analecta Vet* [Internet]. 2001;58–66. Available from: http://old.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol21n1/056_VE21n1_stornelli_inseminacion_caninos.pdf
2. Galvis AZ. Inseminación artificial en caninos como alternativa para mejorar características genéticas. 2016;65.
3. Polge C, Smith AU, Parkes A. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at Low Temperatures. Vol. 164, *Nature* (London). 1949. p. 666.
4. Betancur GR, Oquendo JG, Araque NV. Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y Dimetilformamida. 2011;8(2):9–17.
5. Cerdeira J, Sánchez-Calabuig MJ, Pérez-Gutiérrez JF, Hijo M, Castaño C, Santiago-Moreno J. Cryopreservation effects on canine sperm morphometric variables and ultrastructure: Comparison between vitrification and conventional freezing. *Cryobiology*. 2020;95(September 2019):164–70.
6. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000;60–61:481–92.
7. Mota Filho AC, Teles CHA, Jucá RP, Cardoso JFS, Uchoa DC, Campello CC, et al. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology* [Internet]. 2011;76(7):1367–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.010>

8. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *J Androl.* 1990;11(1):73–88.
9. Olaciregui M, Gil L, Montón A, Luño V, Jerez RA, Martí JI. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology* [Internet]. 2014;68(1):91–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.12.009>
10. Restrepo G, Vasquez N. Inceminación Artificial. 2009;(December):12.
11. B GR, R CAM, R LP, C JED, S AU. Congelación de Semen Epididimal Canino con Yema de Huevo Centrifugada. 2017;28(4):876–85.
12. Universidad Nacional de la Plata Tesis Doctoral MV Jorge Daniel Díaz 2015. 2015;
13. Betancur GR. Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. *Rev CES Med Vet y Zootec* [Internet]. 2009;112. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428102012.pdf>
14. Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde Forsberg C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology.* 2004;62(8):1498–517.
15. Silva AR, de Cássia Soares Cardoso R, Uchoa DC, Machado da Silva LD. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *Vet J.* 2002;164(3):244–6.
16. María Alejandra Stornelli. Advance on artificial insemination in canine. 2017;(March):9.
17. Eilts BE. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology.* 2005;64(3):692–7.
18. Álamo D, Batista M, González F, Rodríguez N, Cruz G, Cabrera F, et al. Cryopreservation of semen in the dog: Use of ultra-freezers of -152°C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology.* 2005;63(1):72–82.
19. Salinas P, Sánchez R, Risopatrón J. Criopreservación de espermatozoides caninos a - 80°C. *Int J Morphol.* 2013;31(1):217–24.
20. Veterinaria P. Inseminacion-artificial-con-semen-fresco-y-criopreservado-en-caninos. 12-Marzp-2. Available from: <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/16892/inseminacion-artificial-con-semen-fresco-y-criopreservado-en-caninos.html>

21. Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, et al. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Res Vet Sci* [Internet]. 2012;93(1):440–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.06.027>
22. Martins MIM, Justino RC, Sant'Anna MC, Trautwein LGC, Souza FF. Comparison of Two Different Extenders for Cryopreservation of Epididymal Dog Sperm. *Reprod Domest Anim*. 2012;47(SUPPL. 6):293–4.
23. Bucak MN. The effects of different egg yolk concentrations used with soy bean lecithin- based extender on semen quality to freeze bull semen *Journal of Veterinary Sciences*. 2016;(January 2010).
24. Nöthling JO, Gerber D, Colenbrander B, Dijkstra M, Bakker T, De Cramer K. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. *Theriogenology*. 2007;67(2):264–75.
25. Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, et al. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci*. 2010;119(3–4):305–13.
26. Alfonso Sánchez R, Arlette Cartagena P, Marco Berland O. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev Investig Vet del Peru*. 2006;17(1):1–7.
27. Uchoa DC, Silva TFP, Mota Filho AC, Silva LDM. Intravaginal Artificial Insemination in Bitches Using Frozen/Thawed Semen after Dilution in Powdered Coconut Water (ACP-106c). *Reprod Domest Anim*. 2012;47(SUPPL. 6):289–92.
28. Zetino JOM. Efectos del extensor comercial de semen porcino bts (beltsville thawing solution), sobre semen canino. 2018;47.
29. Rodriguez YLS, Calvo JES. Comparación de técnicas de colecta seminal : colecta de semen de epidídimo , colecta tradicional y criopreservación , en relación a la calidad espermática , en caninos. 2015;89.
30. Altamirano LS, Pereira PA. Evaluacion de la fertilidad del semen canino fresco

- y congelado, en un perro de raza pitbull terrier, utilizando 3 diluyentes en la clinica veterinaria los andes en quito. 2011;145.
31. De U. Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs ultracongelador de – 152 °c. 2010;234.
 32. Pontón AP, Lagos JP. Efectos de la refrigeración y crioconservación sobre la motilidad y mortalidad de espermatozoides caninos. 2014;112.
 33. Chavez GH. Evaluación de Dos Dilutores sobre los Parámetros Macro , Microscópicos y Funcionales de Semen Conservado de Caninos. 2011;102.
 34. Bonilla CL, Mejía RB. Evaluación de la capacidad fecundante del semen canino congelado , comparando glicerol , etilenglicol y dmsO como crioprotectores en el diluyente tris - glucosa - yema de huevo. 2007;
 35. Granda MDV. Supervivencia y viabilidad espermática canina usando diluyentes de semen y concentraciones crio protectoras en toda la cadena de crio preservación de semen. 2016;84.
 36. Gonzáles DL. Descripción de tres diferentes tecnicas de inseminación artificial en caninos. 2018;68.
 37. Latorre VM, Gonzalo F. Comparación del efecto de la yema de huevo de pata y de gallina sobre parámetros espermáticos en semen canino refrigerado. 2014;43.
 38. Salas CYC. Caracterización básica y funcional del semen del perro sin pelo del peru. 2019;1–58.
 39. Jurado S, Sarmiento P, Stornelli A. La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. 2010;296(1):7–14.
 40. Ochoa A, Torres L. Crioconservación de semen canino y evaluación de su viabilidad espermática a través de microscopía directa e inseminación artificial. 2012;114.
 41. Arango ME, Alvarez LR. Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones del glicerol como crioprotector. 2010;118.
 42. Baratta MEK. Utilización de mediciones testiculares y evaluación seminal estacional en perros ovejero alemán. 2013;42.
 43. Diaz JD. Desarrollo de diluyentes de baja complejidad y costo para la preservación a corto y mediano plazo de semen canino. 2015;95.

44. Peña GSG. Efecto de la centrifugación coloidal previo al proceso de crio conservación sobre la calidad seminal post descongelación en caninos. 2019. 70 p.
45. Alicier MEF. Utilización de imagenología y de medidas testiculares para la evaluación del potencial reproductivo en perros de razas cimarrón uruguayo. 2016;43.
46. Sánchez JDC. Estudio Ecográfico doppler pulsado y color de los testículos en el perro y su utilidad como predictor de la calidad seminal. 2015;163.
47. Díaz J, Valiente C, Corrada Y, Gobello C. Estandarización de la espectrofotometría para la medición de la concentración seminal en el perro doméstico. 2011;31(2):19–22.
48. Montesdeoca PEP. Evaluación de la Adición de Yema de Huevo y Crema de Leche al diluyente, para la Crioconservación del Semen Canino. 2019;76.
49. Mir F, Fontbonne A. Retorno de la fertilidad en un perro con un absceso. 2010;109–14.
50. Stornelli MA, Sota RL De. Fertilidad y supervivencia del semen canino criopreservado. 2010;25(2):29–38.
51. Riquelme AS. Termorresistencia de espermatozoides caninos en semen fresco diluido. 2019;30(1):495–9.
52. Salinas P, Pezo F. Validación de SYBR-14 y 6-CFDA para Evaluar la Viabilidad e Integridad de la Membrana Plasmática en Espermatozoides Caninos de Raza Chihuahua. 2014;32(1):16–21.
53. Riquelme AS, Burgos DG. Evaluación de una prueba hipoosmótica simplificada en semen canino fresco y refrigerado. 2013;506–10.
54. Sánchez A, Zamora P. Efecto del Medio Hipoosmótico sobre la Vitalidad Espermática en Semen Canino. 2016;27(2):288–93.
55. Rondona GRC. Efecto del momento de adición del glicerol durante la curva de enfriamiento sobre la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen canino. 2010;61.
56. Mesa AM, Henao G. Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. 2012;9.

57. Mondadori R, Lucci C. Glycerol , Methyl-Formamide and Dimethyl-Formamide in Canine Semen Cryopreservation. 2010;(September 2019):8.
58. Oliveira EC., Juliani G. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. 2010;116–22.
59. Rota A, Rota A, Martini M, Milani C. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing HAL Id : hal-00900542. 2011;(July 2017):11.
60. Ahuir JAG. Efecto de diferentes fuentes antioxidantes sobre parámetros celulares y capacitación espermática posdescongelado en semen bovino. 2017;(August):7.
61. Deppe M, Pezo F. Criopreservación de Espermatozoides de Canino con Extracto de Hojas de Arándano. 2016;34(2):653–9.
62. Daghigh-kia H, Olfati-karaji R, Hoseinkhani A, Ashrafi I. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. 2014;(March):12.
63. Carlotto R. G, Fernández A. V, Lira M. B. Momento De Adición Del Glicerol Sobre La Calidad Espermática En La Criopreservación De Semen Canino. *Rev Investig Vet del Perú*. 2011;22(3):183–9.
64. Grandhaye J, Partyka A, Ligocka Z, Dudek A, Nizański W, Jeanpierre E, et al. Metformin improves quality of post-thaw canine semen. *Animals*. 2020;10(2):2020.
65. Qamar AY, Fang X, Kim MJ, Cho J. Improved post-thaw quality of canine semen after treatment with exosomes from conditioned medium of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Animals*. 2019;9(11):1–13.
66. Sun L, Wu C, Xu J, Zhang S, Dai J, Zhang D. Addition of butylated hydroxytoluene (BHT) in tris-based extender improves post-thaw quality and motion dynamics of dog spermatozoa. *Cryobiology* [Internet]. 2020;(June). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.006>
67. Kawasaki Y, Sakurai D, Yoshihara T, Tsuchida M, Harakawa S, Suzuki H. Effect of quercetin on the motility of cryopreserved canine spermatozoa. *Cryobiology* [Internet]. 2020;96(May):50–4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.08.006>